

PVT1促进在胶质瘤C6细胞微环境中的BMSCs增殖和迁移*

刘东蓉^{1,2,3}, 刘艳^{1,4}, 吴培连^{1,2,3}, 郑雷蕾^{1,2,3}, 黄小亚^{1,2,3}, 孟雪欢^{1,2,3}, 胡赞^{1,2,3,Δ}

1. 重庆医科大学附属口腔医院(重庆 401145); 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室(重庆 401145);
3. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室(重庆 401145); 4. 重庆医科大学附属第二医院(重庆 400010)

【摘要】 目的 探讨与胶质瘤C6细胞间接共培养后骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖和迁移能力的变化以及长链非编码RNA(lncRNA)浆细胞瘤变异异位基因1(plasmacytoma variant translocation 1 gene, *PVT1*)在这种变化中的作用。方法 分离、培养、鉴定BMSCs后,采用Transwell小室将生长状态良好的BMSCs与胶质瘤C6细胞间接共培养(共培养组),单独培养的正常BMSCs为对照组。CCK8及软琼脂克隆形成实验检测2组细胞的增殖能力,流式细胞术检测细胞周期,划痕实验及Transwell法检测细胞的迁移能力,实时定量PCR(qRT-PCR)检测*PVT1*基因的表达。在共培养组BMSCs中转染si-*PVT1*(si-*PVT1*组)和si-NC(si-NC组),转染后重复上述检测,并增加qRT-PCR检测周期蛋白基因CyclinD1及迁移相关基因基质金属蛋白酶2、9(*MMP2*、*MMP9*)的表达。结果 所用BMSCs具有成骨、成脂分化能力。与对照组相比,共培养组BMSCs体积变小,排列紊乱,细胞间接触抑制消失,增殖及迁移能力增强,S期及G₂期细胞比例增加,*PVT1*表达增加($P<0.05$)。与si-NC组比较,si-*PVT1*组抑制共培养BMSCs的增殖及迁移能力,G₁期细胞比例增加,S期细胞比例减少,*PVT1*、CyclinD1及*MMP2*、*MMP9* mRNA表达也降低($P<0.05$)。结论 胶质瘤C6细胞微环境中BMSCs增殖及迁移能力增强可能与*PVT1*高表达有关。

【关键词】 长链非编码RNA *PVT1* 骨髓间充质干细胞 间接共培养 增殖 迁移

PVT1 Promoted the Proliferation and Migration Ability of BMSCs in Glioma C6 Microenvironment LIU Dong-rong^{1,2,3}, LIU Yan^{1,4}, WU Pei-lian^{1,2,3}, ZHENG Lei-lei^{1,2,3}, HUANG Xiao-ya^{1,2,3}, MENG Xue-huan^{1,2,3}, HU Yun^{1,2,3,Δ}

1. The Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401145, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401145, China; 3. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401145, China; 4. The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Δ Corresponding author, E-mail: 500188@hospital.cqmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the changes in the proliferation and migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after indirect co-culturing with glioma C6 cells, and to examine the role of plasmacytoma variant translocation 1 gene (*PVT1*), a long non-coding RNA (lncRNA), in these changes. **Methods** After separation, cultivation and identification of BMSCs, BMSCs of good growth condition were picked out and indirectly co-cultured with glioma C6 cells in Transwell chambers. These cells are henceforth referred to as the co-culture group. Normal BMSCs cultured separately were the control group. CCK-8 and soft agar colony formation assay were used to examine the proliferation ability of the two groups of cells. Flow cytometry was used to examine the cell cycle. Wound healing assay and Transwell assay were used to explore the migration ability of the cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to examine the genetic expression level of *PVT1* in the two groups. The above-mentioned tests were repeated after the co-cultured BMSCs were transfected with si-*PVT1* (si-*PVT1* group) and si-NC (si-NC group). In addition, qRT-PCR was done to evaluate the expression of CyclinD1, a cell cycle protein gene, and matrix metalloproteinases 2 and 9 (*MMP2* and *MMP9*), the migration-related genes in the si-*PVT1* and si-NC transfected co-cultured BMSCs. **Results** The BMSCs used in the present study possess the capability of osteogenic and adipogenic differentiation. Compared with the control group, the co-cultured BMSCs had smaller size, disorderly arrangement and the lack of intercellular contact inhibition. The proliferation and migration ability was significantly enhanced, the proportions of S and G₂ phase cells greatly increased and the expression level of *PVT1* was significantly up-regulated ($P<0.05$) in the co-cultured group in comparison with those of the control group. When compared with the si-NC group, the si-*PVT1* group showed inhibited proliferation and migration ability of the co-cultured BMSCs; the percentage of G₁ phase cells increased, while that of S phase decreased; the expression of *PVT1*, CyclinD1, *MMP2* and *MMP9* mRNA also decreased ($P<0.05$) in the si-*PVT1* group. **Conclusion** The enhanced proliferation and migration ability of BMSCs in the

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81470772)和重庆市科卫联合医学科研重点项目(No. 2018ZDXM020)资助

Δ 通信作者, E-mail: 500188@hospital.cqmu.edu.cn

glioma C6 microenvironment may be associated with the up-regulated expression of PVT1.

【Key words】 Long non-coding RNA (lncRNA) PVT1 Bone marrow mesenchymal stem cells
Indirect co-culture Proliferation Migration

胶质瘤是中枢神经系统常见的恶性肿瘤,其治疗方式包括手术切除、术后放疗及化疗。但胶质瘤细胞呈浸润性生长以及对放疗不敏感,其总体治疗效果不佳^[1-3]。运用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为载体靶向治疗肿瘤是目前的研究热点之一。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有取材方便、易于体外分离培养等特点,并且能够定向趋化至胶质瘤细胞,可用作载体运输自杀基因、抗肿瘤病毒等靶向治疗胶质瘤^[4-5]。但有研究报道,由于微环境的改变, BMSCs的生物学行为会受到一定程度的影响,出现增殖能力增强,获得体内成瘤能力等变化^[6-7]。

长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一种非编码RNA,虽然不具有编码蛋白质的能力,但是在细胞分化、凋亡、代谢以及胚胎发生等多种生理及病理过程中发挥着重要的调节作用^[8]。浆细胞瘤变异异位基因1(plasmacytoma variant translocation 1 gene, PVT1)是一个邻近癌基因MYC的长链非编码RNA,能够调节多种肿瘤细胞的增殖、迁移以及血管形成能力等^[9-12]。有研究指出与大鼠胶质瘤C6细胞间接共培养后, BMSCs细胞中信号转导与转录激活因子(STAT)3及P-STAT3表达明显增高^[6];同时STAT3作为转录因子能够促进PVT1转录^[11]。因此我们推测PVT1可能会影响与胶质瘤C6细胞间接共培养后的BMSCs的生物学行为。本研究通过将大鼠BMSCs与大鼠胶质瘤C6细胞间接共培养,探讨C6细胞微环境对BMSCs增殖及迁移能力的影响,并揭示PVT1在BMSCs增殖及迁移能力变化中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞系及实验试剂

大鼠胶质瘤C6细胞由重庆医科大学附属儿童医院惠赠; DMEM/F12培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国Hyclone公司; Opti-MEM减血清培养基购于美国Gibco公司; CCK-8试剂盒购于日本同仁公司; 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术公司; Trizol试剂购于日本TaKaRa公司; RT-PCR试剂盒购于美国Promega公司; Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司; 荧光标记的小鼠抗大鼠单抗CD90、CD29、CD31、CD45购于美国Becton Dickinson公司; 油红O染色试剂盒购于美国Sigma公司; 茜素红染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; Transwell小室购于美国康宁公司; PCR引

物、siRNA PVT1(si-PVT1)及其对照si-NC合成于上海生物工程股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs的分离与培养 采用颈椎脱臼法将4周龄的SD雄性大鼠(购于重庆医科大学动物实验中心)处死,体积分数75%乙醇浸泡双下肢5 min,在生物安全柜内采用无菌操作技术分离出双侧股骨和胫骨,将离体骨干放入PBS缓冲液中冲洗并去除附着的肌肉、脂肪等软组织,随后将其转入盛有含10%FBS的DMEM/F12培养基的10 cm皿中,剪去两侧干骺端,暴露髓腔,用5 mL注射器抽取培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨干发白,将骨髓冲洗液转入50 mL离心管中,1 200 r/min离心10 min,弃掉上清液,加入完全培养基重悬后接种于10 cm皿中,培养24 h后半换液,以后隔天换一次液,待细胞融合度达70%~80%时细胞传代结束原代培养。

1.2.2 BMSCs的鉴定

1.2.2.1 表面抗原鉴定 通过流式细胞术检测第三代BMSCs表面抗原CD29、CD90、CD31和CD45的表达,第三代未加抗体的BMSCs作为阴性对照。将第三代BMSCs用胰酶消化后离心并收集至1.5 mL EP管中,分别加入100 μ L CD29、CD31、CD45、CD90抗体,于4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,离心, PBS重悬后过滤至流式管,上流式细胞仪检测。

1.2.2.2 成骨及成脂分化实验 取第三代生长状态良好的BMSCs,消化离心后均匀接种于12孔板中, DMEM/F12培养基常规培养24 h后,换成成骨诱导培养基或者成脂诱导培养基,培养21 d后对成骨诱导组进行茜素红染色,镜下观察是否有钙结节形成;对成脂诱导组进行油红O染色,镜下观察是否有脂滴形成。

1.2.3 BMSCs与C6细胞间接共培养体系的建立 间接共培养体系参考以往文献报道^[6,13]。采用孔径为0.4 μ m的聚碳酸酯膜Transwell悬挂式小室(规格:6孔)进行BMSCs细胞与C6细胞的间接共培养。将 1.5×10^5 个生长状态良好的第三代BMSCs细胞铺板至6孔板中,将同样数量的C6细胞接种至Transwell小室内,分别单独培养过夜,待细胞贴壁后将Transwell小室插入6孔板中进行间接共培养,每72 h进行一次传代。共培养2周后,将BMSCs收集起来进行后续实验。

1.2.4 细胞增殖能力检测

1.2.4.1 CCK-8检测细胞增殖 以2 000细胞/孔的密度将

正常BMSCs(对照组)和共培养后的BMSCs接种于96孔板中,置于细胞培养箱中培养,按照CCK-8试剂盒说明书于1~6 d分别在每孔中加入10 μ L CCK-8溶液,培养箱中孵育3 h,然后使用多功能酶标仪检测450 nm波长的吸光度(A_{450})值。细胞增殖率正比于 A_{450} 值。

1.2.4.2 软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将等体积的1.2%低熔点琼脂糖溶液和含有20%FBS+2%双抗的培养基混匀,注入6 cm皿中,冷却凝固后作为底层琼脂置入细胞培养箱中备用。按照1:1的比例将0.7%低熔点琼脂糖和2 \times 培养基混匀,配制与底层琼脂等体积的上层琼脂,并加入2 000个正常BMSCs(对照组)或者共培养后的BMSCs(细胞悬液体积小于100 μ L),混匀后加入铺有底层琼脂的6 cm皿中,待上层琼脂凝固后置于细胞培养箱中培养14 d,0.05%结晶紫染色5 min,超纯水洗涤数次后晾干,显微镜(100 \times)下观察克隆球形成情况,克隆形成率为大于0.05 mm的克隆球数与所有克隆数的比值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 将正常BMSCs(对照组)和共培养后的BMSCs用胰酶消化后离心,PBS重悬,将细胞转移至1.5 mL离心管内,体积分数70%的预冷乙醇于4 $^{\circ}$ C冰箱固定过夜。检测前在每个样品中加入500 μ L配制好的碘化丙啶(PI)染液,缓慢重悬细胞,37 $^{\circ}$ C避光温浴30 min。使用流式细胞仪FACS-Calibur(美国BD公司)检测。使用Modfit软件分析检测结果,比较处于各细胞周期的细胞比例。

1.2.6 细胞迁移能力检测

1.2.6.1 划痕实验 将正常BMSCs(对照组)和共培养后的BMSCs细胞分别接种于6孔板中,待融合率达90%时使用200 μ L枪尖在孔板制造划痕,枪尖尽量垂直于孔板底部,使用PBS将划脱的细胞洗净,使用无血清的DMEM/F12培养基培养细胞48 h取出细胞用显微镜观察细胞迁移情况并拍照,采用Image软件进行定量处理,划痕愈合率=(0 h划痕面积-48 h划痕面积)/0 h划痕面积 \times 100%。

1.2.6.2 Transwell法 将 3×10^4 个正常BMSCs(对照组)和共培养后的BMSCs细胞分别接种于Transwell(规格:24孔板;孔径:8 μ m)小室上室,并用无血清培养基将细胞悬液体积补足至200 μ L,在下室加入600 μ L含10%FBS的DMEM/F12培养基,随后将细胞置入细胞培养箱中培养24 h后取出细胞,用棉签擦去上室细胞,体积分数4%多聚甲醛固定30 min,0.05%结晶紫染色30 min,超纯水洗涤细胞数次后晾干,在倒置相差显微镜下随机选取3个高倍视野观察并拍照。

1.2.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测细胞PVT1 mRNA 收集正常BMSCs(对照组)、共培养后的BMSCs细胞,采用Trizol试剂提取总RNA,用Promega逆转录试剂盒将5 μ g RNA逆转录为cDNA,按照Promega GoTaq[®] qPCR Master Mix试剂盒说明书进行扩增。以GAPDH为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PVT1 mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of the primers

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product length/bp
GAPDH	GGCTGCCAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG	122
PVT1	TGCTGATTGTTGCCCATCC	CTCACAAGTCGGCGTTCTC	128
CyclinD1	GCATCTACACTGACAACTCTATC	TTGTTCTCATCCGCTCTG	151
MMP2	ACACCAAGAAGCTTCCGACTATCCAATG	CAGTACCAGTGTGAGTATCAGCATCAG	93
MMP9	CTCTGTGCTCCTGGCTCTAG	GCTGTGTGTCCTGAGGTTGG	112

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PVT1: Plasmacytoma variant translocation 1; MMP2: Matrix metalloproteinase 2; MMP9: Matrix metalloproteinase 9.

1.2.8 细胞转染与检测 取对数生长期的共培养BMSCs接种于6孔板中,培养24 h后细胞融合度达50%~60%,按照说明书使用Lipofectamine 2000转染试剂转染,即使用Opti-MEM减血清培养基分别稀释Lipofectamine 2000和si-PVT1/si-NC,再将稀释后Lipofectamine 2000和si-PVT1/si-NC混匀加入细胞中,于细胞培养箱中培养6 h后换液。si-PVT1序列为:F: 5'-GCACUCAUUUCAGCUUUUATT-3', R: 5'-UAAAGCUGAAAUUGAGUGCTT-3'; si-NC序列为:F: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',

R: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。转染si-PVT1或者si-NC的共培养BMSCs在转染12 h后,以3 000细胞/孔的密度接种于96孔板中,CCK-8法检测1~3 d的 A_{450} 值,进行软琼脂克隆形成实验和Transwell迁移实验,转染24 h后在孔板底部制造划痕进行划痕实验,转染48 h后收集细胞进行流式细胞术检测细胞周期和qRT-PCR实验[检测PVT1、CyclinD1、基质金属蛋白酶2、9(MMP2及MMP9)]mRNA表达,以GAPDH为内参照,引物序列见表1,实验方法同前。

1.3 统计学方法

所有数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs的鉴定

流式细胞术结果显示BMSCs细胞表达CD29和CD90, 不表达CD31和CD45, CD29和CD90表达率均为100%, CD31和CD45表达率分别为3.18%和1.67%。BMSCs经成骨诱导液诱导21 d后, 茜素红染色, 显微镜下可观察到铁锈色的钙结节团块(图1A); 成脂诱导21 d后, 油红O染色, 显微镜下可观察到大小不一的油红色脂滴(图1B)。

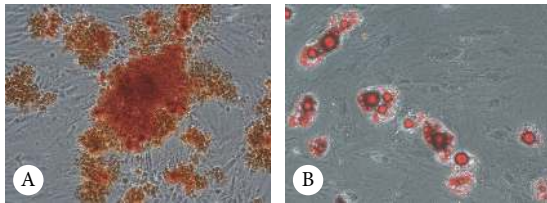


图1 BMSCs经成骨诱导后茜素红染色结果(A, $\times 100$)及经成脂诱导后油红O染色结果(B, $\times 200$)

Fig 1 The result of alizarin red staining after osteogenic induction (A, $\times 100$) and oil red O staining after adipogenic induction (B, $\times 200$) of BMSCs

2.2 共培养的BMSCs增殖和迁移能力增强

如图2所示, 2周后, 对照组细胞传至第7代(P7), 细胞宽大扁平, 排列整齐, 呈多角形或星形; 共培养组细胞体积变小, 排列紊乱, 细胞间接接触抑制消失。CCK-8实验结果(图3A)显示从第3天开始, 共培养组BMSCs增殖能力较对照组增强, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。软琼脂克隆形成实验结果(图3B)显示对照组BMSCs未见克隆球形成, 而共培养组BMSCs可见较多克隆球形成。流式细胞术(图3C)显示共培养组BMSCs处于G₁期的细胞比例[(61.28 \pm 2.66)%]较对照组[(83.88 \pm 3.07)%]减少, S期和G₂期的细胞比例[分别为(22.8 \pm 1.25)%和(15.93 \pm 1.55)%]

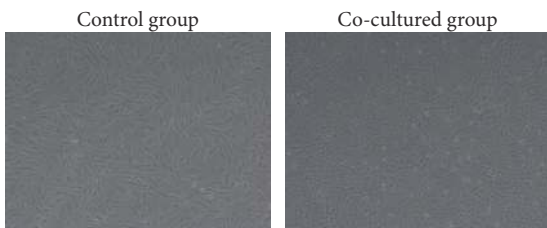


图2 正常培养2周后的BMSCs(P7)和共培养2周之后的BMSCs的形态比较。 $\times 40$

Fig 2 Morphological comparison of normal BMSCs cultured for 2 weeks (P7) and BMSCs co-cultured with C6 cells for 2 weeks. $\times 40$

较对照组[分别为(10.98 \pm 2.2)%和(5.14 \pm 0.88)%]增加。划痕实验示共培养组BMSCs细胞划痕愈合率[(45.3 \pm 2.7)%]较对照组[(11.8 \pm 0.97)%]增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。Transwell迁移实验结果示共培养组BMSCs迁移的细胞数量(511.7 \pm 33.5)较对照组BMSCs(155.7 \pm 28.2)增多($P < 0.001$)。

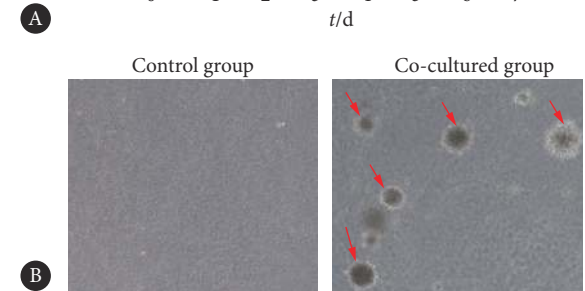
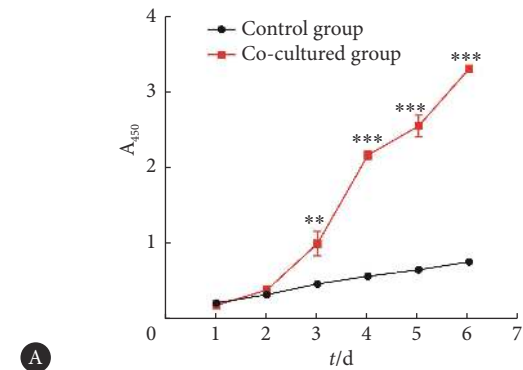


图3

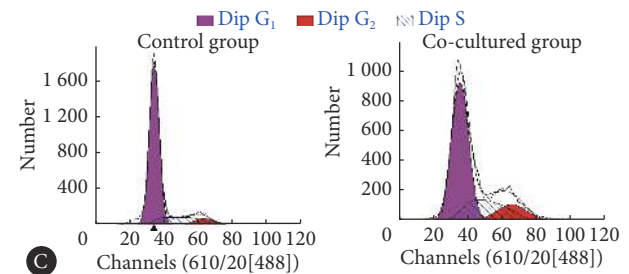


图3 CCK8(A)、软琼脂克隆形成实验(B, $\times 40$; 红色箭头表示形成的克隆球)和流式细胞术(C)检测正常BMSCs和共培养BMSCs的增殖能力

Fig 3 The proliferation ability of normal BMSCs and co-cultured BMSCs detected by CCK8 (A), soft agar colony formation assay (B, $\times 40$; Red arrows indicate cell colonies) and FACS analysis (C)

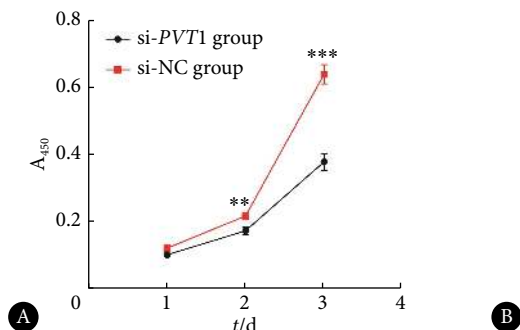
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. control group.

2.3 PVT1对共培养BMSCs增殖能力的影响

qRT-PCR结果显示与对照组(1.000 \pm 0.013)相比, 共培养组BMSCs中PVT1的相对表达量(2.300 \pm 0.101)增加($P < 0.001$); si-PVT1组PVT1的表达量(0.47 \pm 0.02)较si-NC组(1.0 \pm 0.16)降低($P < 0.01$)。

CCK-8实验结果(图4A)显示si-PVT1组增殖能力较si-NC组减弱($P < 0.01$)。软琼脂克隆形成实验结果(图4B)也显示si-PVT1组克隆形成率[(7.81 \pm 0.93)%]较si-NC组[(24.7 \pm 1.48)%]减少($P < 0.01$)。

如图 5 所示, si-*PVT1* 组细胞 G₁ 期比例 [(65.53±2.99)%] 较 si-NC 组 [(49.93±2.75)%] 增加, S 期比例 [(26.17±1.75)%] 较 si-NC 组 [(41.02±1.38)%] 减少, 差异



有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时 qRT-PCR 结果显示 si-*PVT1* 组 CyclinD1 的相对表达量 (0.68 ± 0.08) 较 si-NC 组 (1.0 ± 0.11) 减少 ($P < 0.05$)。

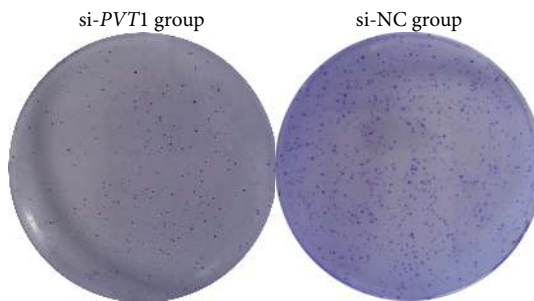


图 4 CCK8 (A) 和软琼脂克隆形成实验 (B) 检测 *PVT1* 对共培养 BMSCs 增殖能力的影响

Fig 4 The effect of *PVT1* on proliferation ability of co-cultured BMSCs detected by CCK8 (A) and soft agar colony formation assay (B)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. si-NC group.

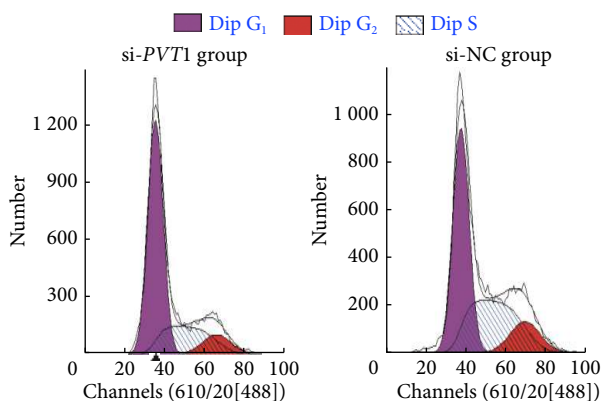


图 5 流式细胞术检测 *PVT1* 对共培养 BMSCs 细胞周期的影响

Fig 5 FACS analysis was used to explore the effect of *PVT1* on the cell cycle of co-cultured BMSCs

2.4 *PVT1* 对共培养 BMSCs 迁移能力的影响

划痕实验结果显示沉默 *PVT1* 后划痕愈合率 [(20.1±1.7)%] 较 si-NC 组 [(61.1±5.4)%] 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。Transwell 实验结果显示 si-*PVT1* 组迁移的细胞数量 (199 ± 30) 较 si-NC 组 (545 ± 97) 减少 ($P < 0.01$)。qRT-PCR 结果显示 si-*PVT1* 组 *MMP2* 及 *MMP9* mRNA 的相对表达量 (分别为 0.52 ± 0.04 和 0.32 ± 0.03) 较 si-NC 组 (分别为 1.0 ± 0.03 和 1.0 ± 0.06) 降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

随着对 BMSCs 生物学特性以及 BMSCs 在肿瘤中的作用的认知日渐深入, 已有大量研究将 BMSCs 作为载体工具靶向治疗肿瘤。但是 BMSCs 是否会受到肿瘤微环境中某些因素的影响导致生物学特性发生改变还有待研究。WANG 等^[14] 用小鼠胃癌细胞系 MFC 的条件培养基培养小鼠 BMSCs 后, BMSCs 的平板克隆形成能力以及迁移能力

增强, 白介素 (IL)-6、趋化因子 C-X-C 基元配体 (CXCL15)、CC 趋化因子配体 2 (CCL2) 以及血管内皮生长因子 (VEGF) 表达量均增高。本研究将 BMSCs 与胶质瘤 C6 细胞通过 Transwell 间接共培养, Transwell 微孔允许细胞产生的可溶性因子等自由交换, 而细胞却不能透过微孔^[15], 以此研究胶质瘤 C6 细胞分泌的细胞因子等对 BMSCs 生物学性能的影响。本研究结果显示与胶质瘤 C6 细胞间接共培养后 BMSCs 的增殖和迁移能力都明显增强, 且共培养后的 BMSCs 具有在软琼脂中增殖形成克隆球的能力, 提示与胶质瘤 C6 细胞共培养后, BMSCs 的生物学特性发生了改变。

PVT1 是一种在肿瘤中具有重要调节作用的 lncRNA^[16-17]。除了调节肿瘤的发生发展外, *PVT1* 也参与调节骨关节炎、心脑血管疾病、糖尿病肾病、肺纤维化、哮喘等疾病的发展过程, 对人主动脉平滑肌细胞、肺纤维细胞、气道平滑肌细胞等非肿瘤细胞的增殖及迁移能力同样具有调节作用^[18-23]。在本研究中, 与胶质瘤 C6 细胞共培养的 BMSCs 细胞 *PVT1* 较正常 BMSCs 明显高表达。通过 si-RNA 片段将 *PVT1* 敲低后, 共培养 BMSCs 的增殖及迁移能力都受到抑制, 表明与胶质瘤 C6 细胞间接共培养的 BMSCs 增殖和迁移能力的改变与 *PVT1* 表达增高有关。CyclinD1 是一种重要的细胞周期蛋白, 能够促进细胞从 G₁ 期向 S 期发展, 促进细胞增殖^[24], qRT-PCR 结果显示敲低 *PVT1* 后细胞周期蛋白 CyclinD1 mRNA 表达量降低, 同时流式细胞术结果表明敲低 *PVT1* 后 G₁ 期细胞比例增多, S 期细胞比例减少, 表明与胶质瘤 C6 细胞间接共培养后 BMSCs 增殖能力的改变与 *PVT1* 导致 BMSCs 细胞周期改变有关。有研究表明 *PVT1* 能够通过降解细胞外基质促进细胞的

迁移能力^[17], *MMP2* 和 *MMP9* 都编码明胶酶, 具有降解IV型胶原蛋白和基底膜蛋白的功能^[25]。在本研究中, 敲低 *PVT1* 后 *MMP2* 和 *MMP9* mRNA表达量也明显降低, 表明 *PVT1* 可能通过促进细胞外基质降解改变胶质瘤C6细胞微环境中BMSCs的迁移能力。

综上所述, 与胶质瘤C6细胞间接共培养之后的BMSCs增殖和迁移能力都明显增强, 且*PVT1*表达增高。干扰*PVT1*的表达后能抑制共培养BMSCs的增殖和迁移能力。*PVT1*对与胶质瘤C6细胞共培养的BMSCs部分生物学性能具有重要的调节作用。本研究对BMSCs在胶质瘤C6细胞微环境中部分生物学行的改变及其机制进行了初步研究, 但是仍存在很多不足, *PVT1*调节共培养BMSCs增殖和迁移能力的机制还需进一步研究。Wnt/ β -catenin信号通路在细胞增殖及迁移过程中具有重要的调节作用^[26-27]。研究报道*PVT1*可通过多种途径间接调节Wnt/ β -catenin信号通路, *PVT1*可作为ceRNA通过miR-619-5p调节Wnt/ β -catenin信号通路中重要组成成分Pygo2, 并进一步调控Wnt/ β -catenin信号通路^[28]; 同时*PVT1*还可通过调控miR-361-3p/SOX9激活Wnt/ β -catenin通路^[29]。在本研究中*PVT1*调节共培养BMSCs的增殖和迁移能力是否也与Wnt/ β -catenin信号通路有关以及其中所涉及的具体机制都有待研究, 这也是我们下一步的研究重心与目标。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] ZHANG Q, XIANG W, YI D Y, *et al.* Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 228[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0977-z>.
- [2] CHEN L, ZENG D, XU N, *et al.* A blood-brain barrier and blood-brain tumor barrier penetrating peptide derived targeted therapeutics for glioma and malignant tumor brain metastases. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(45): 41889-41897.
- [3] 钟佳伟, 牟福玲, 孙鹏飞. 胶质瘤放疗敏感性研究进展. *中国肿瘤*, 2020, 29(4): 299-303.
- [4] YONG R L, SHINOJIMA N, FUEYO J, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res*, 2009, 69(23): 8932-8940.
- [5] HUANG Q, LIU X Z, KANG C S, *et al.* The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(3): 192-202.
- [6] CUI X, LIU J, BAI L, *et al.* Interleukin-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci*, 2014, 105(1): 64-71.
- [7] HE Q, ZOU X, DUAN D, *et al.* Malignant transformation of bone marrow stromal cells induced by the brain glioma niche in rats. *Mol Cell Biochem*, 2016, 412(1/2): 1-10.
- [8] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [9] GUO J, HAO C, WANG C, *et al.* Long noncoding RNA *PVT1* modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation and apoptosis by recruiting EZH2. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 98[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0582-3>.
- [10] HE R Q, QIN M J, LIN P, *et al.* Prognostic Significance of lncRNA *PVT1* and its potential target gene network in human cancers: a comprehensive inquiry based upon 21 cancer types and 9972 cases. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2): 591-608.
- [11] ZHAO J, DU P, CUI P, *et al.* lncRNA *PVT1* promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4094-4109[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0250-z>.
- [12] TIAN Z, CAO S, LI C, *et al.* lncRNA *PVT1* regulates growth, migration, and invasion of bladder cancer by miR-31/CDK1. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4799-4811.
- [13] GUO J, NIU R, HUANG W, *et al.* Growth factors from tumor microenvironment possibly promote the proliferation of glioblastoma-derived stem-like cells *in vitro*. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(4): 1047-1057.
- [14] WANG M, YANG F, QIU R, *et al.* The role of mmu-miR-155-5p-NF- κ B signaling in the education of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by gastric cancer cells. *Cancer Med*, 2018, 7(3): 856-868.
- [15] WANG S, LIU X, HUANG R, *et al.* XIAOPI formula inhibits breast cancer stem cells via suppressing tumor-associated macrophages/C-X-C motif chemokine ligand 1 pathway. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1371[2020-08-31]. <https://sci-hub.ren/10.3389/fphar.2019.01371>. doi: 10.3389/fphar.2019.01371.
- [16] GHAFOURI-FARD S, OMRANI M D, TAHERI M. Long noncoding RNA *PVT1*: a highly dysregulated gene in malignancy. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 818-835.
- [17] WANG W, ZHOU R, WU Y, *et al.* *PVT1* promotes cancer progression via microRNAs. *Front Oncol*, 2019, 9: 609[2020-08-31]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00609/full>. doi: 10.3389/fonc.2019.00609.
- [18] LI S, ZHAO X, CHENG S, *et al.* Downregulating long non-coding RNA *PVT1* expression inhibited the viability, migration and phenotypic switch of PDGF-BB-treated human aortic smooth muscle cells via targeting miR-27b-3p. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 335-348.
- [19] LI Y, SUN W, PAN H, *et al.* lncRNA-*PVT1* activates lung fibroblasts via miR-497-5p and is facilitated by FOXM1. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 213: 112030[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112030>.

- [20] YU X, ZHE Z, TANG B, *et al.* α -Asarone suppresses the proliferation and migration of ASMCs through targeting the lncRNA-PVT1/miR-203a/E2F3 signal pathway in RSV-infected rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(7): 598–608.
- [21] LU X, YU Y, YIN F, *et al.* Knockdown of PVT1 inhibits IL-1 β -induced injury in chondrocytes by regulating miR-27b-3p/TRAF3 axis. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106052[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106052>.
- [22] LU J, XU F, LU H. LncRNA PVT1 regulates ferroptosis through miR-214-mediated TFR1 and p53. *Life Sci*, 2020, 260: 118305[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118305>.
- [23] LIU D W, ZHANG J H, LIU F X, *et al.* Silencing of long noncoding RNA PVT1 inhibits podocyte damage and apoptosis in diabetic nephropathy by upregulating FOXA1. *Exp Mol Med*, 2019, 51(8): 1–15.
- [24] SEILER R, THALMANN G N, ROTZER D, *et al.* CCND1/CyclinD1 status in metastasizing bladder cancer: a prognosticator and predictor of chemotherapeutic response. *Mod Pathol*, 2014, 27(1): 87–95.
- [25] WEBB A H, GAO B T, GOLDSMITH Z K, *et al.* Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in *in vitro* models of retinoblastoma. *BMC Cancer*, 2017, 17:343[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3418-y>.
- [26] HUANG X, ZHONG R, HE X, *et al.* Investigations on the mechanism of progesterone in inhibiting endometrial cancer cell cycle and viability via regulation of long noncoding RNA NEAT1/microRNA-146b-5p mediated Wnt/ β -catenin signaling. *IUBMB Life*, 2019, 71(2): 223–234.
- [27] WU T, WANG L N, TANG D R, *et al.* SOST silencing promotes proliferation and invasion and reduces apoptosis of retinoblastoma cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Gene Ther*, 2017, 24(7): 399–407.
- [28] ZHOU C, YI C, YI Y, *et al.* LncRNA PVT1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer via activating Wnt/ β -catenin and autophagy pathway through modulating the miR-619-5p/Pygo2 and miR-619-5p/ATG14 axes. *Mol Cancer*, 2020, 19: 118[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01237-y>.
- [29] QI G, LI L. Long non-coding RNA PVT1 contributes to cell growth and metastasis in non-small-cell lung cancer by regulating miR-361-3p/SOX9 axis and activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110100[2020-08-31]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110100>.

(2020-09-04收稿, 2021-03-16修回)

编辑 吕 熙